



MORGAN L. FITCH, JR.
FRANCIS A. EVEN*
JULIUS TABIN
JOHN F. FLANNERY*
ROBERT B. JONES
JAMES J. SCHUMANN
JAMES J. HAMILL
TIMOTHY E. LEVSTIK
JOSEPH E. SHIPLEY
KENNETH H. SAMPLES
PHILIP T. PETTI
JOSEPH T. NABOR
STEVEN C. SCHROER
RICHARD A. KABA*
KARL R. FINK
MARK W. HETZLER
TIMOTHY P. MALONEY
JAMES P. KRUEGER
STEPHEN S. FAVAKEH
EDWARD W. GRAY, JR.*
RICHARD E. WAWRZYNIAK
STEVEN G. PARMELEE
SHERRI N. BLOUNT*
BRUCE R. MANSFIELD
KENDREW H. COLTON*
G. PAUL EDGELL*
RICHARD W. SCHUMACHER
MICHAEL A. SANZO*

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

ATTORNEYS AND COUNSELLORS AT LAW

Established in 1859

SUITE 401L - 1801 K STREET, NW
WASHINGTON, D.C. 20006-1201

TELEPHONE (202) 419-7000

FACSIMILE (202) 419-7007

ILLINOIS OFFICE

SUITE 1600 - 120 SOUTH LA SALLE STREET, CHICAGO, ILLINOIS 60603-3406

TELEPHONE (312) 577-7000

CALIFORNIA OFFICE

SUITE 250 - 9276 SCRANTON ROAD, SAN DIEGO, CA 92121-7707

TELEPHONE (858) 552-1311

COLORADO OFFICE

SUITE 213 - 1942 BROADWAY, BOULDER, COLORADO 80302

TELEPHONE (303) 402-6966

CHRISTOPHER E. GEORGE*
SCOTT J. MENGHINI
EDWARD E. CLAIR
SANDRA V. SCAVO
JON A. BIRMINGHAM
RUDY KRATZ
RAMON R. HOCH*
JOHN E. LYHUS
STEVEN M. FREELAND
DONNA E. BECKER
SEAN R. O'DOWD
MICHAEL G. VRANICAR
BRIAN S. CLISE
MARTIN R. BADER
DEREK L. PRESTIN
MARK A. BORSOS
DAVID R. JAGLOWSKI
W. BRIAN EDGE*

PATENT AGENTS

ERIC J. WHITESSELL
JONATHAN H. BACKENSTOSE
LILIA I. SAFONOV

OF COUNSEL

THOMAS F. LEBENS
GEORGE W. SPELLMIRE, JR.
LISA M. SOMMER

March 11, 2004

Commissioner of Patents
U.S. Patent and Trademark Office
2011 South Clark Place
Customer Window
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03
Arlington, VA 22202

Re: Submission of Priority Document
Appl. No.: 10/784,914
Filed: February 24, 2004
Title: **Process for the Preparation of
L-Amino Acids Using Strains of the
Enterobacteriaceae Family**
Inventor(s): Rieping, Mechthild
Atty. Dkt.: 7601/80980

Dear Sir:

The following documents are being forwarded for appropriate action by the U.S. Patent and Trademark Office:

1. Submission of Priority Document in Accordance with the Requirements of Rule 55 with certified copy of DE 10 2004 003 410.9 attached; and
2. Return postcard.

*ADMITTED TO D.C. BAR; D.C. PRACTICE OF
ALL OTHERS LIMITED TO FEDERAL COURTS
AND AGENCIES

Commissioner of Patents

March 11, 2004

Page 2

Applicant does not believe that any fee is due for the filing of these documents. However, the Commissioner is hereby authorized to charge any fee deficiency with respect to this filing and any other fee required in connection with the present case, or credit any overpayment, to our Deposit Account No. 06-1135 under Order No. 7601/80980.

It is respectfully requested that the enclosed postcard be stamped with the date the enclosed documents are received by the PTO and that it be returned as soon as possible.

Very truly yours,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

A handwritten signature in black ink, reading "Michael A. Sanzo". The signature is written in a cursive style with a large, stylized "M" and "S".

Michael A. Sanzo
Reg. No. 36,912
Attorney for Applicant

MAS:ct
Enclosures



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

re patent application of:

Rieping, Mechthild

Appl. No.: 10/784,914

Filed: February 24, 2004

For: **Process for the Preparation of
L-Amino Acids Using Strains of
the Enterobacteriaceae Family**

Art Unit: to be assigned

Examiner: to be assigned

Atty. Dkt.: 7601/80980

**Submission of Priority Document
in Accordance with the Requirements of Rule 55**

Commissioner of Patents
U.S. Patent and Trademark Office
2011 South Clark Place
Customer Window
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03
Arlington, VA 22202

Sir:

Please accept the enclosed certified copy of priority documents DE 10 2004 003 410.9, filed on January 23, 2004, for which benefit under 35 U.S.C. § 119/365 is being claimed in the above-captioned application. In the event priority to the enclosed foreign application has not been claimed, it is claimed hereby.

Respectfully submitted,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

By Michael A. Sanzo

Michael A. Sanzo
Reg. No. 36,912
Attorney for Applicant

Date March 11, 2004
1801 K Street, N.W., Suite 401L
Washington, DC 20006-1201
Phone: (202) 419-7013



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 003 410.9

Anmeldetag: 23. Januar 2004

Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
40474 Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie
Enterobacteriaceae

IPC: C 12 N 1/21

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Klostermayer

Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung
5 von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das eno-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, hergestellt werden.
15 Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der
20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie

- Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von
- 5 Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2nd Edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1996) zu finden.

Aufgabe der Erfindung

- 10 Aufgabe der Erfindung ist es, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung
- 15 von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens die für das eno-Gen kodierende Nukleotidsequenz oder dessen Allele verstärkt
- 20 wird bzw. werden.

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-
- 25 Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

- Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder
- 30 Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene um mindestens eine (1) Kopie erhöht,

einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym oder Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Durch die Maßnahmen der Verstärkung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder
- 10 Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht. Als Ausgangs-Mikroorganismus wird der Mikroorganismus verstanden, an dem die erfinderischen Maßnahmen durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet,

15 dass man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das eno-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele
- 20 verstärkt, in einem Medium unter Bedingungen geeignet für die Bildung des eno-Genproduktes,
- b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei
- 25 gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (≥ 0 bis 100%) davon im Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

Die insbesondere rekombinanten Mikroorganismen, die

30 ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol

herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei
 5 der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Rekombinante Mikroorganismen werden durch Transformation, Konjugation oder Transduktion mit die gewünschte Gene
 10 tragenden Vektoren hergestellt.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- Escherichia coli H4581 (EP 0 301 572)
- 15 - Escherichia coli KY10935 (Bioscience
 Biotechnology and Biochemistry 61(11):1877-1882 (1997))
- Escherichia coli VNIIGenetika MG442 (US-A-4278,765)
- Escherichia coli VNIIGenetika M1 (US-A-4,321,325)
- Escherichia coli VNIIGenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- 20 - Escherichia coli BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)
- Escherichia coli kat 13 (WO 98/04715)
- Escherichia coli KCCM-10132 (WO 00/09660).

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind
 25 beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))

- *Serratia marcescens* TLR156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
 - *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992)).
- 5 L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz
- 10 gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie
- 15 beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich
- 20 Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-
- 25 Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der
- 30 Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-
- 35 Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-

Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-
5 Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Verstärkung, insbesondere Überexpression des eno-Gens, in verbesserter Weise L-
10 Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

Die Nukleotidsequenzen der Gene von Escherichia coli gehören zum Stand der Technik (Siehe nachfolgende Textstellen) und können ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)) publizierte Genomsequenz
15 von Escherichia coli entnommen werden.

Das eno-Gen wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung:	Enolase, Phosphopyruvate Hydratase
Funktion:	Enolisierung (Wasserabspaltung): 20 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat in der Glycolyse
EC-Nr.:	EC 4.2.1.11
Referenz:	Spring TG. und Wold F.; The Journal of Biological Chemistry 246(22): 6797-6802 25 (1971) Klein et al.; DNA Sequence 6(6): 351-355 (1996) Gulick et al.; Biochemistry 40(51): 15716 - 15724 (2001) 30 Kaga et al.; Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66(10): 2216-2220 (2002) Accession No.: AE000361

Das eno-Gen von Salmonella typhimurium wird unter anderem in folgender Referenz beschrieben: Garrido-Pertierra A.; Revista Espanola de Fisiologia 36(1): 33-39 (1980).

Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des
5 National Center for Biotechnology Information (NCBI) der
National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der
Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies
Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge,
UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan)
10 entnommen werden.

Der besseren Übersichtlichkeit halber sind die
Nukleotidsequenz des eno-Gens und die Aminosäuresequenz des
Genproduktes von Escherichia coli als SEQ ID NO:3 und 4
wiedergegeben.

15 Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene
können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können
Allele der Gene verwendet werden, die sich aus der
Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch
funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“)
20 ergeben. Die Verwendung endogener Gene wird bevorzugt.

Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“
versteht man die in der Population einer Art vorhandenen
Gene oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Zu den geeigneten Allelen des eno-Gens gehören solche,
25 welche funktionsneutrale Mutationen bzw. Sinnmutationen
(„sense mutations“) enthalten. Hierzu zählen unter anderem
solche, die zu mindestens einem (1) konservativen
Aminosäureaustausch in dem von ihnen kodierten Protein
führen. Die maximale Anzahl an konservativen
30 Aminosäureaustauschen kann 2, 3, 5, 10, 20, in keinem Fall
aber mehr als 30 Aminosäuren betreffen. Durch die genannten
konservativen Aminosäureaustausche wird die

Funktionsfähigkeit um 0% bis maximal 24%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% oder 1% erniedrigt oder erhöht.

- Bei den aromatischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Phenylalanin, Tryptophan und
- 5 Tyrosin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den hydrophoben Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Leucin, Isoleucin und Valin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den polaren Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Glutamin und
- 10 Asparagin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den basischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Arginin, Lysin und Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den sauren Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Asparaginsäure und
- 15 Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den Hydroxyl-Gruppen enthaltenden Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Serin und Threonin gegeneinander ausgetauscht werden. Alle übrigen Aminosäureaustausche werden als nicht-konservative
- 20 Aminosäureaustausche bezeichnet.

- In gleicher Weise können auch solche Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für Varianten der genannten Proteine kodieren, die zusätzlich am N- oder C-Terminus eine Verlängerung oder Verkürzung um mindestens eine (1)
- 25 Aminosäure enthalten. Diese Verlängerung oder Verkürzung beträgt nicht mehr als 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 oder 2 Aminosäuren oder Aminosäurereste.

- Zu den geeigneten Allelen zählen auch solche, die für Proteine kodieren, in denen mindestens eine (1) Aminosäure
- 30 eingefügt (Insertion) oder entfernt (Deletion) ist. Die maximale Anzahl derartige als Indels bezeichneter Veränderungen kann 2, 3, 5, 10, 20 in keinem Falle aber mehr als 30 Aminosäuren betreffen.

Zu den geeigneten Allelen gehören ferner solche die durch Hybridisierung, insbesondere unter stringenten Bedingungen unter Verwendung von SEQ ID No. 3 oder Teilen davon insbesondere der Kodierregionen bzw. der dazu
5 komplementären Sequenzen, erhältlich sind.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH
10 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit
15 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die
20 Hybridisierungsreaktion wird im Allgemeinen bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein
25 Puffer entsprechend 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter
30 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine
35 Temperatur von ca. 50°C - 68°C, ca. 52°C - 68°C, ca. 54°C -

- 68°C, ca. 56°C - 68°C, ca. 58°C - 68°C, ca. 60°C - 68°C, ca. 62°C - 68°C, ca. 64°C - 68°C, ca. 66°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend
- 5 0,2x SSC oder 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens
- 10 96% bis 99% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).
- 15 Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
- So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden
- 20 Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch
- 25 induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus
- 30 des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch

Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), in 5 PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) und in bekannten 10 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. 15

- In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia; 20 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eine für das eno-Gen kodierende 25 Nukleotidsequenz oder Allel trägt.

Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

- Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression 30 der jeweiligen Gene betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Nähere Erläuterungen zu den Begriffen der Genetik und Molekularbiologie findet man in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4th ed., Springer Verlag, New York (USA), 2000) oder dem Lehrbuch von Berg, Tymoczko and Stryer (Biochemistry, 5th ed., Freeman and Company, New York (USA), 2002) oder dem Handbuch von Sambrook et al. (Molekular Cloning, A Laboratory Manual, (3-Volume Set), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001).

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des eno-Gens, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu verstärken. Die Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 99/18228),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen ((WO 02/064808),

- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- 5 • das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 01/92545),
- 10 • das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen (WO 03/004598),
- 15 • das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen (WO 03/004664),
- das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsH-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- 20 • das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsI-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende crr-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- 25 • das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen (WO 03/004670),
- das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen (WO 03/004665),

- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (WO 03/038106),
- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen
5 (WO 03/038106),
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons
10 (WO 03/004663),
- das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (WO 03/006666),
- das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen (WO 03/006666),
15
- das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
20
- das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
25
- das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),

- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- 5 ◦ das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen des suc ABCD-Operons (WO 03/008615),
- das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008615),
- das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen (WO 03/076635),
- 10 ◦ das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen (WO 03/076635), und
- das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997))

15 verstärkt werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des eno-Gens, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- 20 ◦ das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- 25 ◦ das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),

- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
- 5 • das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (WO 02/29080),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (WO 02/36797),
- 10 • das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (WO 02/081721), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist,
- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (WO 02/081698), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,
- 15 • das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung katF-Gen bekannt ist, und
- das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen (WO 03/008603)
- 20 abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder

25 mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das

30 entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-
5 Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des eno-Gens, unerwünschte Nebenreaktionen
10 auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im
15 batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die
20 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise
25 den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und

Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

- 15 Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden.

- 20 Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- 25 Die Fermentation wird im allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,0, insbesondere 6,0 bis 8,0, durchgeführt. Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure
30 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika
35 hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen

aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Verwendete Minimal- (M9) und Vollmedien (LB) für Escherichia coli sind von J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Ligation, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung werden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation von Escherichia coli wird, wenn nicht anders beschrieben, nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)) durchgeführt.

Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen und Transformanten ist 37°C.

Beispiel 1

Konstruktion des Expressionsplasmides pTrc99Aeno

- 5 Das eno-Gen aus E. coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz des eno-Gens in E. coli K12 MG1655 (Accession Number AE000361, Blattner et al. (Science 277: 10 1453-1474 (1997)) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Die Primer enthalten Sequenzen für Restriktionsenzyme, die in der unten dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert sind. Der Primer eno1 enthält die 15 Restriktionsschnittstelle für XbaI, der Primer eno2 die für HindIII.

eno1:

5' - GTTTGTCTAGAGTTTCAGTTTAACTAGTGAC - 3' (SEQ ID No. 1)

eno2:

- 20 5' - CCGGAGGCTGGCAAGCTTAAATCAG - 3' (SEQ ID No. 2)

- Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 1381 bp großes DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern 25 unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit der Vent-DNA-Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) amplifiziert werden (SEQ ID No. 3).

- 30 Das amplifizierte eno-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI restringiert und nach Aufreinigung (Purification Kit, QIAGEN, Hilden,

- Deutschland) in einem 0,8%igen Agarosegel überprüft. Der Vektor pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wird mit den Enzymen HindIII und XbaI gespalten, und mit dem restringierten eno-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm
- 5 TOP10 One Shot (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) wird mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA Isolierung durch die
- 10 Kontrollspaltung mit dem Enzymen HindIII/XbaI und PvuI nachgewiesen werden. Das Plasmid wird als pTrc99Aeno (Figur 1) bezeichnet.

Beispiel 2

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442/pTrc99Aeno

- 15 Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.
- 20 Der Stamm MG442 wird mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Expressionsplasmid pTrc99Aeno und mit dem Vektor pTrc99A transformiert und auf LB Agar mit 50 µg/ml Ampicillin Plasmid tragende Zellen selektioniert. Die erfolgreichen Transformationen können nach der Plasmid DNA Isolierung
- 25 durch die Kontrollspaltungen mit den Enzymen HindIII/XbaI bestätigt werden. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442/pTrc99Aeno und MG442/pTrc99A. Ausgewählte Einzelkolonien werden anschließend auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung: 3,5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/l
- 30 KH_2PO_4 , 1 g/l NH_4Cl , 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar, 50 mg/l Ampicillin, weiter vermehrt. Die Bildung von L-Threonin wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l

Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin, beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert.

- Je 250 µl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin) überimpft und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Induktion der Expression des eno-Gens wird in Parallelansätzen 100 mg/l Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt. Die Bildung von L-Threonin durch den Ausgangsstamm MG442 wird in der gleichen Weise überprüft, wobei jedoch keine Zugabe von Ampicillin zum Medium erfolgt. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Düsseldorf, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.
- Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierte Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.
- In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	Zusätze	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	-	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	-	3,8	1,3
MG442/pTrc99Aeno	-	2,6	1,7
MG442/pTrc99Aeno	IPTG	5,1	2,6

Kurze Beschreibung der Figur:

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die
5 verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende
Bedeutung:

- Amp: Ampicillinresistenzgen
- lacI: Gen für das Repressorprotein des trc-Promotors
- Ptrc: trc-Promotorregion, IPTG-induzierbar
- 10 • eno: Kodierregion des eno-Gens
- 5S: 5S rRNA-Region
- rrnBT: rRNA-Terminator-Region

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende
Bedeutung

- 15 • HindIII: Restriktionsendonuklease aus Haemophilus
influenzae R_c
- PvuI Restriktionsendonuklease aus Proteus
vulgaris

- XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas campestris*

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Threonin, dadurch gekennzeichnet, dass
man folgende Schritte durchführt:
 - 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen man das eno-Gen oder
dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele
verstärkt,
 - 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
 - c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei
gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe
und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder
15 Anteilen (≥ 0 bis 100%) davon im Produkt
verbleiben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man
zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der
20 gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
25 verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man die Expression des (der) Polynukleotids (e),
das (die) für das eno-Gen kodiert (kodieren), erhöht.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
30 dass man die regulatorischen und/oder katalytischen

Eigenschaften des Polypeptids (Proteins) verbessert oder erhöht, für das das Polynukleotid eno kodiert.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren
- 5 Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die
- 10 Threoninsynthese kodierende thrABC-Operon,
- 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
- 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
- 15 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
- 6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
- 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
- 20 6.7 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
- 6.8 das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen,
- 6.9 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,
- 25 6.10 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen,
- 6.11 das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen,

- 6.12 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
- 6.13 das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems kodierende ptsI-Gen,
- 5 6.14 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente kodierende crr-Gen,
- 6.15 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen,
- 10 6.16 das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen,
- 6.17 das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen,
- 6.18 das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,
- 15 6.19 das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,
- 6.20 das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
- 20 6.21 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen,
- 6.22 das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen,
- 6.23 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen,
- 25 6.24 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen,
- 6.25 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen,

- 6.26 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen,
- 6.27 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen
- 5 6.28 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,
- 6.29 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,
- 10 6.30 das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,
- 6.31 das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,
- 15 6.32 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,
- 6.33 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen, und
- 20 6.34 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen

verstärkt.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 25

- 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,

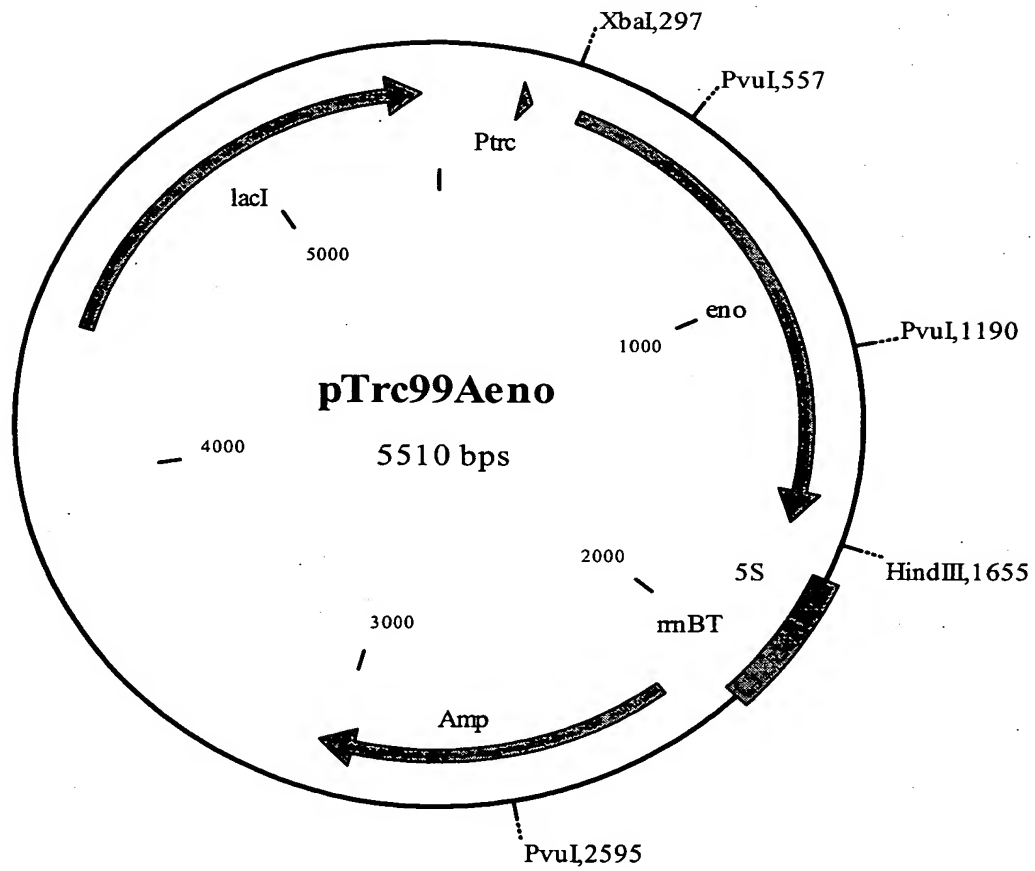
- 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,
- 7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa,
- 5 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
- 7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,
- 10 7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,
- 7.7 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
- 7.8 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
- 15 7.9 das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen und
- 7.10 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen
- 20 abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.
8. Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung Escherichia, in denen das eno-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt vorliegt.
- 25 9. Mikroorganismen, gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass diese L-Threonin produzieren.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen man das eno-Gen oder dafür
kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt,
- 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure.

Figur 1: Karte des Plasmides pTrc99Aeno



SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Degussa AG

<120> Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von
Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

10 <130> 020479 BT

15 <160> 4

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(31)
30 <223> eno1

<400> 1
gtttgtctag agtttcagtt taactagtga c 31

35 <210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(25)
45 <223> eno2

<400> 2
ccggaggctg gcaagcttaa atcag 25

50 <210> 3
<211> 1381
<212> DNA
<213> Escherichia coli

55 <220>
<221> PCR-Produkt
<222> (1)..(1381)
60 <223>

<220>
<221> CDS

<222> (46)..(1344)

<223> eno-Gen

5 <400> 3
 gtttgtctag agttttcagtt taactagtga cttgaggaaa accta atg tcc aaa atc 57
 Met Ser Lys Ile
 1

10 gta aaa atc atc ggt cgt gaa atc atc gac tcc cgt ggt aac ccg act 105
 Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg Gly Asn Pro Thr
 5 10 15 20

15 gtt gaa gcc gaa gta cat ctg gag ggt ggt ttc gtc ggt atg gca gct 153
 Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Gly Phe Val Gly Met Ala Ala
 25 30 35

20 gct ccg tca ggt gct tct act ggt tcc cgt gaa gct ctg gaa ctg cgc 201
 Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala Leu Glu Leu Arg
 40 45 50

25 gat ggc gac aaa tcc cgt ttc ctg ggt aaa ggc gta acc aaa gct gtt 249
 Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val Thr Lys Ala Val
 55 60 65

30 gct gcg gta aac ggc ccg atc gct cag gcg ctg att ggc aaa gat gct 297
 Ala Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Leu Ile Gly Lys Asp Ala
 70 75 80

35 aaa gat cag gct ggc att gac aag atc atg atc gac ctg gac ggc acc 345
 Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp Leu Asp Gly Thr
 85 90 95 100

40 gaa aac aaa tcc aaa ttc ggc gcg aac gca atc ctg gct gta tct ctg 393
 Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu Ala Val Ser Leu
 105 110 115

45 gct aac gcc aaa gct gct gca gct gct aaa ggt atg ccg ctg tac gag 441
 Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met Pro Leu Tyr Glu
 120 125 130

50 cac atc gct gaa ctg aac ggt act ccg ggc aaa tac tct atg ccg gtt 489
 His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr Ser Met Pro Val
 135 140 145

55 ccg atg atg aac atc atc aac ggt ggt gag cac gct gac aac aac gtt 537
 Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala Asp Asn Asn Val
 150 155 160

60 gat atc cag gaa ttc atg att cag ccg gtt ggc gcg aaa act gtg aaa 585
 Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala Lys Thr Val Lys
 165 170 175 180

65 gaa gcc atc cgc atg ggt tct gaa gtt ttc cat cac ctg gca aaa gtt 633
 Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His Leu Ala Lys Val
 185 190 195

70 ctg aaa gcg aaa ggc atg aac act gct gtt ggt gac gaa ggt ggc tat 681
 Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp Glu Gly Gly Tyr
 200 205 210

75 gcg ccg aac ctg ggt tcc aac gct gaa gct ctg gct gtt atc gct gaa 729
 Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala Val Ile Ala Glu
 215 220 225

gct gtt aaa gct gct ggt tat gaa ctg ggc aaa gac atc act ttg gcg 777
 Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp Ile Thr Leu Ala
 230 235 240

5 atg gac tgc gca gct tct gaa ttc tac aaa gat ggt aaa tac gtt ctg 825
 Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Tyr Val Leu
 245 250 255 260

10 gct ggc gaa ggc aac aaa gcg ttc acc tct gaa gaa ttc act cac ttc 873
 Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu Phe Thr His Phe
 265 270 275

15 ctg gaa gaa ctg acc aaa cag tac ccg atc gtt tct atc gaa gac ggt 921
 Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser Ile Glu Asp Gly
 280 285 290

20 ctg gac gaa tct gac tgg gac ggt ttc gca tac cag acc aaa gtt ctg 969
 Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln Thr Lys Val Leu
 295 300 305

ggc gac aaa atc cag ctg gtt ggt gac gac ctg ttc gta acc aac acc 1017
 Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe Val Thr Asn Thr
 310 315 320

25 aag atc ctg aaa gaa ggt atc gaa aaa ggt atc gct aac tcc atc ctg 1065
 Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala Asn Ser Ile Leu
 325 330 335 340

30 atc aaa ttc aac cag atc ggt tct ctg acc gaa act ctg gct gca atc 1113
 Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr Leu Ala Ala Ile
 345 350 355

35 aag atg gcg aaa gat gct ggc tac act gca gtt atc tct cac cgt tct 1161
 Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile Ser His Arg Ser
 360 365 370

ggc gaa act gaa gac gct acc atc gct gac ctg gct gtt ggt act gct 1209
 Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala Val Gly Thr Ala
 375 380 385

40 gca ggc cag atc aaa act ggt tct atg agc cgt tct gac cgt gtt gct 1257
 Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser Asp Arg Val Ala
 390 395 400

45 aaa tac aac cag ctg att cgt atc gaa gaa gct ctg ggc gaa aaa gca 1305
 Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu Gly Glu Lys Ala
 405 410 415 420

50 ccg tac aac ggt cgt aaa gag atc aaa ggc cag gca taa gactgacttt 1354
 Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala
 425 430

atctgattta agcttgccag cctccgg 1381

55 <210> 4
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

60 <400> 4
 Met Ser Lys Ile Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg
 1 5 10 15

65

Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Gly Phe Val
 20 25 30
 5 Gly Met Ala Ala Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala
 35 40 45
 Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val
 50 55 60
 10 Thr Lys Ala Val Ala Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Leu Ile
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Ala Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp
 85 90 95
 15 Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110
 Ala Val Ser Leu Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met
 115 120 125
 20 Pro Leu Tyr Glu His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr
 130 135 140
 25 Ser Met Pro Val Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala
 145 150 155 160
 Asp Asn Asn Val Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala
 165 170 175
 30 Lys Thr Val Lys Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His
 180 185 190
 35 Leu Ala Lys Val Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp
 195 200 205
 Glu Gly Gly Tyr Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala
 210 215 220
 40 Val Ile Ala Glu Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp
 225 230 235 240
 Ile Thr Leu Ala Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly
 245 250 255
 45 Lys Tyr Val Leu Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu
 260 265 270
 50 Phe Thr His Phe Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser
 275 280 285
 Ile Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln
 290 295 300
 55 Thr Lys Val Leu Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe
 305 310 315 320
 Val Thr Asn Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala
 325 330 335
 60 Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr
 340 345 350
 65 Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile
 355 360 365

Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala
370 375 380

5 Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser
385 390 395 400

Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu
405 410 415

10 Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala
420 425 430